

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Mariana Brousková

Nové šlechtitelské techniky u kulturních rostlin

New breeding techniques in crop plants

Bakalářská práce

Školitel: **prof. RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc.**

Konzultant: **RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.**

Praha, 2016

Poděkování:

Děkuji panu profesorovi Opatrnému za odborné vedení práce, dobré rady a hlavně za vstřícnost při konzultacích, které mi pomohly vypracovat bakalářskou práci. Také bych ráda poděkovala panu doktorovi Fischerovi za věcné připomínky ohledně skladby bakalářské práce a za rady ohledně pochopení a fungování molekulárních principů šlechtitelských technik.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. 8. 2016

Podpis

Abstrakt

V současné době, kdy neustále roste lidská populace a tím i poptávka po objemu a kvalitě potravy, se vyvíjí snaha o zlepšování technologií využívaných k fungování dnešního zemědělství. Jedním z hlavních pilířů zemědělství je současné spektrum kulturních rostlin, které jsou lidem k dispozici. Toto spektrum je klasickým šlechtěním po staletí obohacováno o nové kultivary plodin či o plodiny zcela nové a od konce minulého století navíc rozšiřováno o geneticky modifikované plodiny. S nimi ale přišla nedůvěřivost společnosti a snaha legislativně geneticky modifikované rostliny ošetřit a omezit jejich využití. Mimo jiné i z těchto důvodů byly hledány účinné a společensky přijatelné alternativy k standardním GM technikám. Zásadní přínos v tomto ohledu nabízí soubor metod zahrnovaných pod název „Nové šlechtitelské techniky“ – New Breeding Techniques – NBTs. Tato práce je shrnuje a vysvětluje základní principy jejich fungování.

Klíčová slova: šlechtění rostlin, nové šlechtitelské techniky, NBTs, evropská legislativa.

Abstract

Nowadays when human population and demand for quantity and quality of food constantly grow, there is effort to improve technologies, which are used to functioning currently agriculture. Currently spectrum of crop plants, which are available for people, is one of main basis of agriculture. This spectrum is enriched of new cultivars or new crop by classical breeding for centuries. From the end of 20th century spectrum is further expanded on genetically modified plants. However, there were distrustfulness of human society and therefore genetically modified plants were legislatively restricted about their use and cultivation. *Inter alia*, for these reasons effective and socially acceptable alternatives of standart GM techniques were searched. Set of methods, which was named „New breeding techniques“- NBTs, provides such benefits. This work summarizes NBTs and explains basic principles of their use.

Key words: European legislation, plant breeding, new breeding techniques, NBTs.

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. Úvod	2
2. Šlechtění rostlin	3
2.1. Klasické šlechtění rostlin	3
2.1.1. Prvotní šlechtění rostlin	3
2.1.2. Mendelovy zákony dědičnosti	3
2.1.3. Metodiky indukované mutagenese	4
2.2. Šlechtění pomocí genetických modifikací	4
2.3. Legislativa ošetřující genetické modifikace v EU	5
2.4. Nové šlechtitelské techniky (New breeding techniques, NBTs)	6
3. Základní techniky	8
3.1. Místně specifické nukleázy	8
3.1.1. Oprava dvoušroubovicového zlomu	9
3.1.2. Rozdělení místně specifických nukleáz	9
3.1.3. Nukleázy se zinkovými prsty	9
3.1.4. TALENs	10
3.1.5. CRISPR/Cas9 systém	10
3.2. Oligonukleotidy řízená mutagenese	12
3.3. RNA dependentní DNA metylace	12
4. Transferové techniky	13
4.1. Roubování non-GM (geneticky nemodifikovaných) roubů na GM podnož	13
4.2. Agroinfiltrace	15
5. Koncepční techniky	16
5.1. Cisgeneze a intrageneze	16
5.2. Reverzní křížení	19
5.3. Syntetická genomika	21
6. Analytické techniky	22
7. Závěr	23
Seznam použité literatury	26

Seznam použitých zkratk

ALS – acetolaktátsyntáza

AGO4 – Argonaute4; protein vázající vlákno sRNA

CRISPR/Cas9 – systém bakteriální ochrany proti cizorodé DNA, využívá se jako prostředek pro směrovanou mutagenezi

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DSB(s) – double strand break (-s); dvoušroubovicový zlom (dvoušroubovicové zlomy)

GM – geneticky modifikovný (-é)

GMO(s) – geneticky modifikovaný organismus (geneticky modifikované organismy)

HGT – horizontální genový přenos (transfer)

NBT(s) – new breeding technique (-s); nová šlechtitelská technika (nové šlechtitelské techniky)

NHEJ – nonhomologous end joining; nehomologní spojení konců

ODM – oligonucleotides directed mutagenesis; oligonukleotidy řízená mutageneze

OLTA - OverLap extension PCR and TA-cloning

PAM - protospacer adjacent motifs; motivy přilehlé k protospaceru (místu stěpení Cas9)

RdDM – RNA dependent DNA methylation; RNA dependentní methylace DNA

RGEN – RNA-guided endonuclease; endonukleáza směrovaná pomocí RNA

RISC - RNA-induced silencing complex; umlčující komplex indukovaný RNA

RNA – ribonukleová kyselina

SDNs – site directed nucleases, místně řízené nukleázy

sgRNA - single guide RNA; typ chimerické RNA, která v systému CRISPR rozpoznává určitou sekvenci

siRNA – small interfering RNA; malá RNA, která je podstatná v procesech RNA interference včetně RdDM

TALEN(s) – Transcription Activator Like Effector Nuclease(-s)

TFO(s) – triple helix-forming oligonucleotides, oligonukleotidy vytvářející trojitý helix

ZFN(s) – zinc finger nuclease(-s); nukleáza (-y) se zinkovými prsty

ZFP – zinc finger protein; protein se zinkovými prsty

1. Úvod

Rostoucí lidská populace, kvalita životního prostředí, objem a kvalita potravin - to jsou hlavní problémy, jimž je současná civilizace vystavena. Jejich spojujícím článkem je mimo jiné zemědělství, a to jeho rozsah, struktura, či technologie. Základním pilířem zemědělské produkce je pak spektrum kulturních plodin, které jsou lidem k dispozici.

Trvalá je snaha o vývoj nových kultivarů kulturních plodin, či alespoň o vylepšení vlastností těch stávajících. V tomto procesu je využíváno jak technik klasického šlechtění, tak i metodik dávajících vznik geneticky modifikovaným (GM) rostlinám. Pomocí technik tzv. přímého přenosu genů byly mimo jiné vytvořeny desítky nových odrůd odolných vůči škodlivému hmyzu (tzv. insekt rezistentní, IR plodiny) nebo tolerantních k totálním herbicidům, kterými zemědělci hubí plevele (tzv. herbicid tolerantní, HT plodiny). GM techniky již byly mj. použity v přípravě plodin tzv. biofortifikovaných - rostlina se vložením určitého genu či genů obohatí o nutrienty, vitamíny či jiné prospěšné látky. Známými případy jsou vložení genů pro biosyntézu provitaminu A v endospermu rýže (Ye et al. 2000), či zvýšení antokyanů v plodech rajčat (Butelli et al. 2008). Ovšem geneticky modifikované rostliny vzhledem k obsahu cizorodé DNA vyvolávají u části lidské populace obavy a rozpolcenost, i proto je jejich pěstování a využití celosvětově legislativně ošetřeno, přičemž legislativa Evropské unie upravená Směrnicí 2001/18/ES je patrně nejprísnější normou (více viz 2.3. Legislativa ošetřující genetické modifikace).

Vzhledem k omezením spojeným s GM rostlinami se v nedávné době jako produkt základního i aplikovaného výzkumu v biotechnologických firmách i mimo ně podařilo nalézt alternativy k postupům přímého genového přenosu. Byl vytvořen seznam osmi šlechtitelských technik, které by neměly odporovat přesvědčení společnosti (v cílovém organismu se nevyskytuje cizorodá DNA, výsledkem tedy dostáváme rostlinu, která by mohla být získána i klasickými technikami) a zároveň neodporuje současným evropským legislativním normám. Souhrnně byly pojmenovány jako „Nové šlechtitelské techniky“ (New breeding techniques, NBTs; Lusser et al. 2011).

Tato práce přináší přehled Nových šlechtitelských technik, vysvětluje jejich princip a použití a na závěr zhodnocuje jejich výhody a nevýhody oproti klasickému šlechtění a šlechtění pomocí genetických modifikací.

2. Šlechtění rostlin

2.1. Klasické šlechtění rostlin

2.1.1. Prvotní šlechtění rostlin

Klasické šlechtění živočichů i rostlin je postaveno na dvou základních metodikách kopírujících přírodní mechanizmy – tedy mutagenezi, s následnou selekcí výhodných nových forem a pohlavním křížením/hybridizací. Vlastní šlechtění rostlin má počátky před 5000 – 10 000 lety v domestikaci planých rostlin (Hussain 2015). K té docházelo v koevolučním procesu zahrnujícím vývoj lidstva a rostlin. Jako příklady mohou sloužit dnešní kukuřice, která byla domestikována a vyšlechtěna z divoké trávy (*Teosintia*) Mexičany před 9 000 lety (Hake & Ross-Ibarra 2015), nebo rýže *Oryza sativa*, jež byla vyšlechtěna z *O. rufipogo* v oblasti Asie přibližně před 8000 lety (Sweeney & McCouch 2007).

Šlechtění zpravidla začíná výběrem a křížením rodičovských rostlin s vhodnými vlastnostmi, které chceme zkombinovat. Následně (v F₂ a několika následných generacích) vzniknou segregující populace potomků, u nichž lze provádět selekci na přítomnost požadovaných vlastností (Miladinovic et al. 2015). U selekcí prováděnými prvními zemědělci se zpočátku jednalo hlavně o intuitivní záležitost. Vybíraly se rostliny s vlastnostmi, které nejlépe vyhovovaly potřebám lidí – např. intenzivní růst, velký objem semen, odolnost k nepříznivým podmínkám prostředí. Jejich semena se opět zasela, a tak se daná vlastnost upřednostnila. Za vznik těchto nových znaků zodpovídaly zejména nahodilé změny v genomu organismů, do určité míry vyvolané faktory daného prostředí. Později docházelo k vytváření prvních geneticky stabilních kultivarů a to především u druhů, které byly schopny samoopylení, či u druhů vegetativně se rozmnožujících.

2.1.2. Mendelovy zákony dědičnosti

Genetické mechanismy podmiňující a řídící dědičnost se staly předmětem systematického zkoumání teprve v 18-19. století. Jeho finální etapa byla nakonec postulována v komplexu Mendelových zákonů dědičnosti (Mendel 1865).

Mendel svou práci založil na experimentech s hrachem *Pisum sativum*, na němž si vymezil hlavní zkoumané znaky – např. rozdíl ve zbarvení děloh semene, rozdíl ve zbarvení slupky semene, rozdíl ve tvaru zralého lusku, rozdíl v barvě nezralého lusku, rozdíl v postavení květů a rozdíl v délce osy. Tehdy se ale nevědělo, že nositeli genetické informace jsou geny. Mendel proto pro nositele dědičnosti zavedl termín „faktor“, který specifikoval takto - podle Mendela byl každý znak kontrolován dvěma faktory, přičemž faktory pro dva odlišné znaky se dědí nezávisle (Mendel pracoval s geny, které nebyly ve vazbě). Faktory (dnes chápány jako alely, formy genů) se podle Mendela nemísí, jsou buď dominantní, nebo recesivní. Přičemž potomci F₁ generace (tj. první filiální generace; první generace potomků), vzniklí ze dvou homozygotních kultivarů hrachu jsou gene-

ticky všichni stejní. Fenotypově mají podobu rodiče nesoucího dominantní znak. Nicméně v následné F2 generaci (tj. druhé filiální generaci), již vykazují rostliny hrachu dva rozdílné fenotypy a to v přesně daných, statisticky změřitelných poměrech (3:1). Náhodnou segregací faktorů (alel) pak vznikají rostliny jak homozygotní – nesoucí jen jeden znak ve dvou stejných faktorech, tak heterozygotní – nesoucí znak ve dvou rozdílných faktorech. Heterozygoti a homozygoti v dominantním znaku vykazují stejný fenotyp (tvoří tak tři čtvrtiny všech potomků), kdežto homozygotní jedinci v recesivním znaku fenotyp jiný (jen jedna čtvrtina potomků). Jak v samičích, tak v samčích gametách se faktory rozřídí dle statistických pravidel (1:1). Později byla tato pravidla ještě doplněna o další poznatky a zaveden pojem „gen“ a „alela“, které nahradily původní „faktor“.

2.1.3. Metodiky indukované mutagenese

Od počátku minulého století si věda i praxe postupně ověřily použitelnost různých technik tzv. „indukované“ mutagenese. Indukované mutace jsou navozeny známými faktory, jež jsou označovány za mutageny. Mutageny mohou být fyzikálního (rentgenové záření, γ -záření) nebo chemického charakteru (tzv. chemomutageny, zpravidla alkylační, či sulfonační látky). Pro obvyklé použití této metodiky, je však podstatný fenomén nahodilosti místa tohoto mutagenního zásahu v molekule DNA, a nahodile tedy vznikají i změny ve fenotypu ovlivněné rostliny. Po aplikaci mutagenního faktoru tak vědec (či šlechtitel) musí provádět často velmi náročnou (časově či technicky) selekci mutantů s požadovanými znaky. V šlechtitelské praxi, zejména u semeny se množících rostlin, je i v současnosti indukovaná mutagenese stále ještě okrajově využívanou metodou, například v kombinaci s androgenézí *in vitro* u ječmene (Vagera et al. 2004).

2.2. Šlechtění pomocí genetických modifikací

Před již více jak čtyřiceti lety získává pozornost nová technologie „přímého genového přenosu“, dnes známá jako „transgenóza“, vedoucí ke vzniku geneticky modifikovaných (GM) plodin (Grunewald & Bury 2016; Halford 2003). Přesně identifikovaný gen či malá skupina genů téměř libovolného původu – od virových po lidské – jsou vnášeny buď pomocí vhodných vektorů (viz 4.2. Agroinfiltrace) nebo bezvektorově do cílové rostlinné buňky, v níž mohou být následně integrovány a jejich následná exprese je zajištěna obvyklou cestou DNA/RNA/protein. GM technologie vedly ke konstrukci nejrozličnějších typů GM plodin, využívaných zemědělskou praxí více než dvacet let.

V mnoha státech světa, zejména v těch evropských, však nadále přetrvává proti GM plodinám politicko-společenský odpor. Ač je z většiny motivován směsí převážně iracionálních důvodů, či přirozeným strachem z neznámého (Drobník 2008), zásadním způsobem (zejména skrze omezování pěstování GM kulturních rostlin v klasickém zemědělství) brání většímu uplatnění těchto moderních molekulárních technik ve šlechtění plodin a to zejména v Evropské unii, kde je legisla-

tiva přísnější (celosvětově je legislativa spíše regulující). Mimo jiné je řadu let odpůrci GMO prosazována metodologie „Green Breeding“, tedy „Zeleného šlechtění“, která současně vylučuje využití GM postupů či produktů i v tzv. ekologickém zemědělství.

2.3. Legislativa ošetřující genetické modifikace v EU

Geneticky modifikované organismy (GMO) spadají pod směrnici o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí Evropského parlamentu a rady 2001/18/ES ze dne 12. března 2001 (Parlament & Rada Evropské Unie 2001). Tato směrnice ustanovuje geneticky modifikovaným organismem každý organismus s výjimkou lidí, který má změněn svůj genom způsobem, kterého by se přirozeně nedocílilo pářením či přirozenou rekombinací. Techniky, které jsou tímto prohlášením považovány za vedoucí či nevedoucí ke genetickým úpravám jsou přesně stanoveny. Technikami vedoucími ke genetickým modifikacím jsou:

- techniky rekombinace nukleových kyselin využívající viry, bakteriální plasmidy či jiné vektorové systémy pro vkládání nukleových kyselin, které se v organismu přirozeně nevyskytují a jsou schopné se dále množit
- techniky přímého zavádění genetického materiálu připraveného vně organismu zahrnující mikroinjekci, makroinjekci a mikroenkapsulaci
- hybridizační techniky nebo buněčná fúze, při kterých dochází k fúzi dvou či více buněk za vzniku živé buňky s novými kombinacemi dědičného genetického materiálu, jež se v organismu přirozeně nevyskytují

Techniky, které nevedou ke genetické modifikaci, pokud nezahrnují použití rekombinantních molekul nukleové kyseliny nebo geneticky modifikované organismy získané výše popsanými technikami, jsou:

- oplodnění in vitro
- konjugace, transdukce, transformace nebo jiné obdobné přirozené procesy
- indukce polyploidie

Zároveň jsou zde vyčleněny techniky, jejichž výsledkem jsou organismy, na které se tato směrnice nevztahuje za předpokladu, že neobsahují rekombinantní molekuly nukleové kyseliny, nebo jsou to GMO vzniklé některou z níže popsaných technik, jako je:

- mutagenese
- buněčná fúze (včetně fúze protoplastů rostlinných buněk) organismů, u nichž může být výměny genetického materiálu dosaženo tradičními šlechtitelskými metodami

Geneticky modifikované organismy včetně rostlin jsou v legislativě ČR ošetřeny několika zákony, přesněji zákonem o zemědělství (předpis č. 252/1997 sb.), zákonem o Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském (Předpis č. 147/2002 Sb.) a vyhláškou o bližších podmínkách pěstování geneticky modifikovaných odrůd (Předpis č. 89/2006 Sb.), které upřesňují způsob nakládání a pěstování GMO a jejich kontrolu.

2.4. Nové šlechtitelské techniky (New breeding techniques, NBTs)

Jeden z hlavních argumentů, kterým lidé oponují proti technikám GM, je riziko, které vzniká vložením cizorodé rekombinantní DNA do organismu, ve kterém se přirozeně nevyskytuje (Hartung & Schiemann 2014). Zásadní přínos v realizaci nové, účinné a společensky přijatelné alternativy k standardním GM technikám nabízí soubor metod zahrnovaných pod název „Nové šlechtitelské techniky“ – New Breeding Techniques – NBT. I ty jsou však v současnosti podrobovány podrobnému hodnocení s cílem stanovit zejména jejich překryv se standardními GM technikami a tak přinejmenším dočasně zabránit jejich praktickému využití.

V případě většiny NBTs se žádná cizorodá, rekombinantní DNA do genomu výsledné rostliny či organismu nevkládá (s výjimkou ZFN – 3, intrageneze, více viz 3.1. Místně specifické nukleázy; 5.1. Cisgeneze a intrageneze). Proto podle zde zmíněných podmínek ze Směrnice o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí Evropského parlamentu a rady 2001/18/ES (viz 2.3. Legislativa ošetřující genetické modifikace) většina produktů NBT nespadá do kategorie geneticky modifikovaných organismů, i přesto, že je pro jejich vznik využíváno nových molekulárních technik. Jejich použitím lze výrazně napomáhat klasickému šlechtitelství.

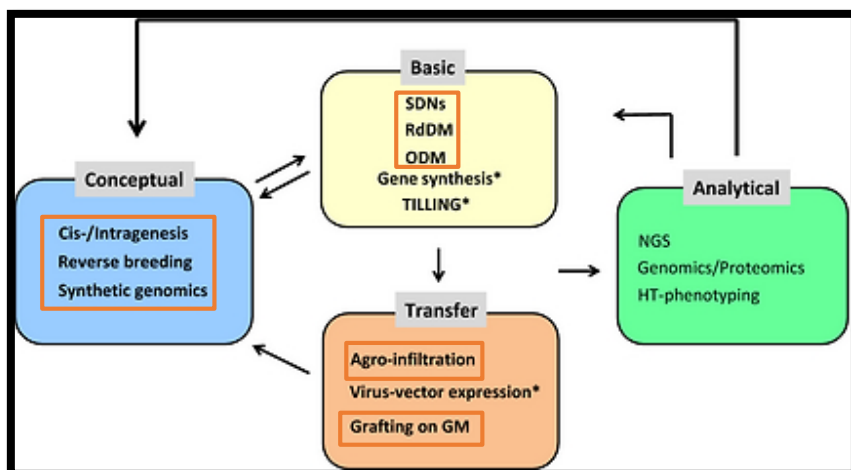
Mezi NBTs spadají podle práce Lusser et al. 2011 následující techniky:

- cílené změny genomu pomocí metodiky „zinkových prstů“ (ZFN-1, ZFN-2, ZFN-3)
- cílená mutageneze pomocí oligonukleotidů
- cisgeneze a intrageneze
- DNA metylace prostřednictvím malých RNA (RdDM)
- roubování non-GM roubů na GM podnože
- reverzní křížení
- agroinfiltrace
- syntetická genomika

Uvedený soubor je již na první pohled metodicky i historicky značně heterogenní. Zahrnuje techniky založené na dávno známých zahradnických postupech (roubování), dále inovace některých základních postupů biotechnologických (reverzní šlechtění s významným podílem přípravy dihaploidních linií) či postupy založené na obdobných krocích jako techniky přípravy GM organismů (cisgeneze a intrageneze). K zásadně novým postupům tak lze počítat pouze komplex

technik směřujících k cílené a velice specifické mutagenезi, respektive editaci původních genomů (místně specifické nukleázy – zejména pak nukleázy se zinkovými prsty, CRISPR/Cas9 systém, či transkripčním aktivátorům podobné efektorové nukleázy), a k cílené epimutagenезi malými RNA.

Původní seznam, uvedený v materiálu studie Lusser et al. 2011, se proto pokusili co možná logicky roztrždit zejména Hartung & Schiemann 2014, z jejich review je také převzato následující schéma (viz Obrázek 1:)



Obrázek 1:

Rozdělení nových šlechtitelských technik do čtyř skupin podle jejich použití a jejich možné propojení.

Nové šlechtitelské techniky jsou ve schématu zvýrazněny červeně.

Převzato a upraveno podle (Hartung & Schiemann 2014)

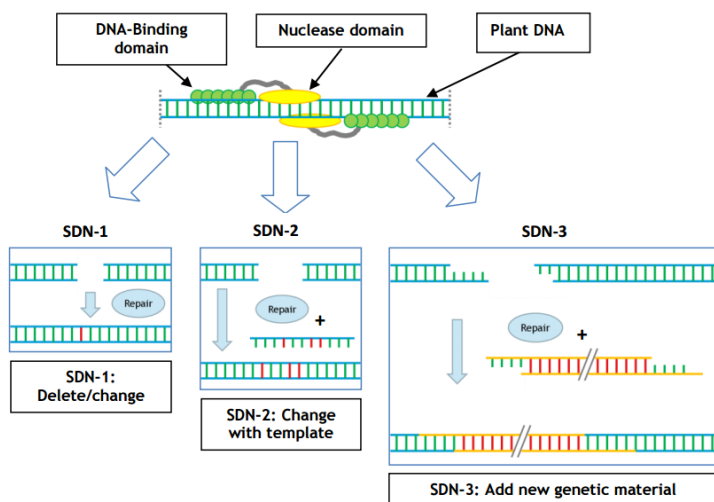
3. Základní techniky

Mezi základní techniky tedy podle Hartunga & Schiemanna 2014 řadíme mutagenézy řízené místně specifickými nukleázami (site-directed nuclease; SDN), oligonukleotidy řízenou mutagenézi a RNA dependentní DNA metylaci. Všechny tyto techniky spojuje jejich použití při cílené mutagenézi již existujícího rostlinného genomu pomocí mutací, inzercí (např. malého několik nukleotidů dlouhého úseku) či delecí nebo genového umlčení (epimutagenézy).

3.1. Místně specifické nukleázy

Mezi místně specifické nukleázy (site directed nucleases; SDN) řadíme metodiku nukleáz se zinkovými prsty (zinc finger nucleases; ZFN), meganukleázy, transkripčním aktivátorům podobné efektorové nukleázy (Transcription Activator Like Effector Nucleases; TALENs) a CRISPR/Cas9 systém (Hartung & Schiemann 2014).

Místně specifické nukleázy byly skupinou New Techniques Working Group (NTWG) of EU Member (založenou evropskou komisí v roce 2007) rozdělena dle způsobu a typu navozené mutace na tři základní skupiny: SDN-1, SDN-2 a SDN-3 (New plant breeding techniques. *European Commission: Plants* [online]. [cit. 2016-07-24]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm). Ve zde přiloženém obrázku (viz. Obrázek 2) jsou tyto skupiny rozděleny na příkladu ZFN-1, ZFN-2 a ZFN-3.



Obrázek 2

Základní rozdělení místně řízených nukleáz podle toho, co se s nimi do buňky vkládá.

Na příkladu tří typů ZFN.

SDN-1: vytvoření jen dvoušroubovického zlomu, samovolná oprava

SDN-2: Vytvoření dvoušroubovického zlomu a zároveň jeho oprava pomocí templátu s několika nukleotidovými záměnami

SDN-3: Po vytvoření DSB, se zlom opravuje podle templátu, který obsahuje oproti původní sekvenci nový genetický materiál, a tím se tato informace cíleně vloží do genomu

Převzato z (Documentation: Fact sheets on the different techniques. New breeding techniques for plants: A source of innovation for the agrofood chain and beyond [online]. 2015 [cit. 2016-06-24]. Dostupné z: <http://www.nbtplatform.org/background-documents/factsheets/factsheet-site-directed-nucleases.pdf>)

3.1.1. Oprava dvoušroubovicového zlomu

Dvoušroubovicový zlom způsobený štěpením endonukleázou se v rostlinné buňce opravuje buňce vlastními reparačními mechanismy, a to buď homologní rekombinací pomocí templátu (sesterská chromatida, vložený opravný templát) nebo nehomologním spojením konců (nonhomologous end joining; NHEJ). V případě NHEJ se nevyužívá žádného pomocného opravného templátu, proto v průběhu reparace dochází k mutacím, inzercím či delecím, což může mimo jiné způsobit jak změny čtecího rámce, tak inaktivaci genu, ale i mutaci bez posunu či inaktivace. Naopak pomocí homologní rekombinace se může dosáhnout jak delece či inserce v několika párech bazí, tak i přenosu celých genů do místa zlomu (gene targeting), při čemž je využíváno vloženého opravného templátu (Gaj et al. 2013).

3.1.2. Rozdělení místně specifických nukleáz

V případě první skupiny SDN - SDN-1, zde na příkladu ZFN - 1 jsou oba geny vkládány do buněk rostlin bez jakéhokoliv opravného templátu, proto ve chvíli, kdy nukleáza rozstřípne DNA v předem určeném úseku, reparační mechanismy tento dvojité zlom opraví samovolně. Během reparace může docházet ke specifickým mutacím v několika párech bazí či ke krátkým delecím a inzercím. V případě druhé skupiny místně specifických nukleáz, SDN-2, se s geny pro ZFN-2 do buňky současně vnáší opravný templát s několika nukleotidovými záměnami, který je jinak homologní k vybrané oblasti DNA. Poté, co endonukleáza vytvoří dvoušroubovicový zlom, přirozené reparační mechanismy tento zlom opraví podle vneseného opravného templátu pomocí homologní rekombinace. Takto vzniknou specifické mutace v jednom či několika párech bazí, dle předem vybraných nukleotidových záměn. U třetí skupiny SDN-3, zde u ZFN-3, je při vkládání genů pro ZFN - 3 do buňky vnesen i různě dlouhý úsek DNA, který v případě délky větší než 20 bp je legislativně považován za GM (Parlament & Rada Evropské Unie 2001). Tento úsek má na svých koncích oblasti homologní oblastem zlomu. V důsledku toho je tento úsek DNA přepsán (začleněn) do genomu buňky pomocí homologní rekombinace (Lusser et al. 2011).

3.1.3. Nukleázy se zinkovými prsty

Metodika nukleáz se zinkovými prsty, patřící do skupiny SDN, využívá nukleáz, které dokáží nespecificky štípat deoxyribonukleové kyseliny (DNA). ZFN se skládají ze dvou domén, z domény proteinu se zinkovými prsty (Zinc finger protein; ZFP) a z endonukleázy. Protože jsou ZF nukleázy heterodimery, tak jsou do buňky vkládány ve dvou genech (Lusser et al. 2011). Endonukleázou je obvykle nespecifická štěpná doména *FokI* vytvářející jednořetězcový zlom DNA, doména zinkových prstů, která se na svém C-konci připojuje k doméně *FokI*, slouží k rozpoznávání vybrané cílové části DNA (Weeks et al. 2015). Proto je při vytváření ZFNs s předem plánovanými specifickými místy rozpoznávání tato doména velmi důležitá (Durai et al. 2005). Každý motiv zinkového prstu se skládá přibližně ze 30 aminokyselin a nejčastěji se váže na 3 (-4) následné nukleotidy v DNA. Má podobu $\beta\beta\alpha$ struktury, při čemž nejběžnějším motivem vázajícím DNA u Eukaryot

je Cys₂-His₂ zinc-finger motiv (Pavletich & Pabo 1991 cit. podle Durai et al. 2005). Každá ZFN se nejčastěji skládá ze tří nebo čtyř těchto rozpoznávacích zinkových proteinů (Puchta & Fauser 2014). Vzhledem k tomu, že příprava rekombinantních genů pro domény se zinkovými prsty rozpoznávajícími specifické sekvence DNA je velmi zdlouhavá, je zde tlak na vyvíjení rychlejšího způsobu jejich vytváření. Jednou z možností, nabízí OLTA (OverLap extension PCR and TA-cloning). Základem této techniky je, že rozpoznávací domény obsahující 4-6 fragmentů zinkových prstů jsou syntetizovány pomocí overlap-extension PCR, které jsou následně spojeny s nukleázovým vektorem díky TA-klonování. Výhodou této techniky je, že primery kódující specifické úseky rozpoznávací domény mohou být opakovaně použity (Fujii et al. 2013)

3.1.4. TALENs

Metodika využívající TALENs pracuje na podobném principu jako ZFNs. Proteiny TALE se přirozeně vyskytují v gramnegativní fytopatogenní bakterii *Xanthomonas* (Scholze & Boch 2010), což bylo poprvé zjištěno na konci minulého století (Bonas et al. 1989). Původně nebyly rozpoznávací proteiny pojmenovány TALE, ale označeny jako efekторы AvrBs3-rodiny (Jankele & Svoboda 2014). TALEN je heterodimer, který je tvořen nespecifickou nukleázou *FokI* a specifickou vazebnou doménou pro DNA z TALE proteinů, které se skládají z 12 – 27 repetitivních domén o 33 – 35 aminokyselinách (Schornack et al. 2006; Gaj et al. 2013; Puchta & Fauser 2014). TALENs opět vytváří na předem vybraném místě genomu dvoušroubovicový zlom, který je opraven přirozenými reparačními mechanismy (Weeks et al. 2015).

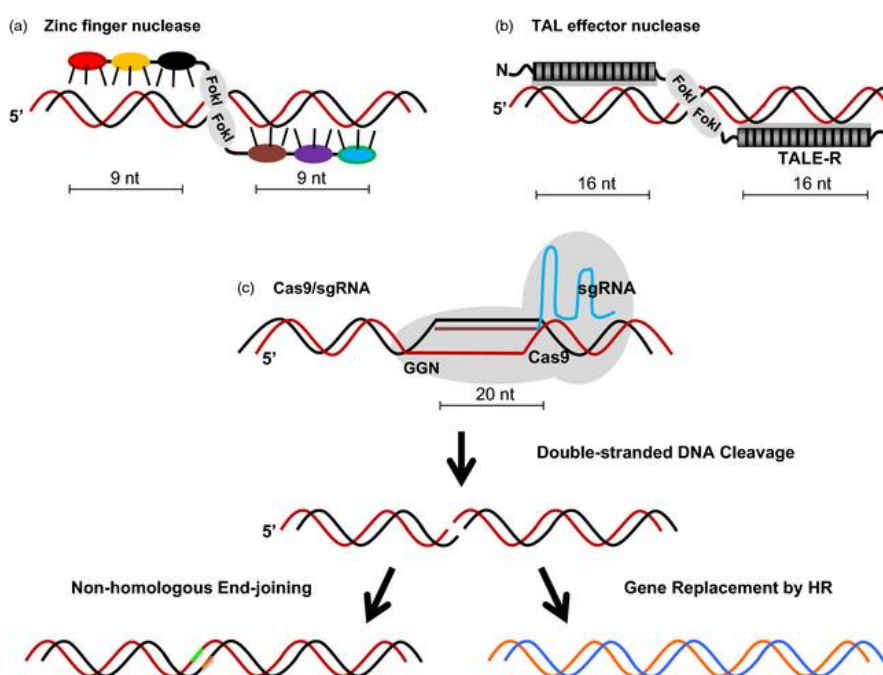
Tuto metodiku lze využít u nejrůznějších rostlin. Například u rýže je možné tímto postupem vytvářet zlomy v endogenním rýžovém genu *waxy*. Díky následné NHEJ v něm tak lze vytvářet somatické mutace, které jsou dědičné v dalších generacích (Nishizawa-Yokoi et al. 2016).

3.1.5. CRISPR/Cas9 systém

CRISPR/Cas9 je nejnovější metodika zahrnutá do SDN, její výhoda spočívá především v rychlosti vytvoření rekombinantních konstruktů pro vyvolání zlomu v daném cílovém místě a univerzalitě jejich použití. Přirozené systémy spřažené s CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) zajišťují bakterii *Streptococcus pyogenes* adaptivní imunitu proti invazivní DNA přes CRISPR RNAs (crRNAs), které navádí spřažené systémy k cizorodé DNA pro její inaktivaci. Pro správné navedení CRISPR-spřaženého enzymu Cas9, který je DNA endonukleázou a vytváří dvoušroubovicový zlom (který je poté opraven reparačními prostředky buňky), je potřeba dvojité RNA struktury složené ze zralé crRNA a trans-activating crRNA (tracrRNA; Jinek et al. 2012; Gaj et al. 2013). Univerzalita této techniky spočívá v tom, že na crRNA se nachází PAM (protospacer adjacent motifs) místo, které je podstatné pro rozpoznání endonukleázou Cas9. V PAM místě u *S. pyogenes* se nachází jen dva nukleotidy nutné pro jeho rozpoznání (G, G), což umožňuje vytvářet mnoho typů crRNA, protože tato sekvence (G, G) je v genech velmi běžná (Jiang

et al. 2013). V případě, že se z obou typů RNA vytvoří chiméra crRNA:tracrRNA (single guide RNA; sgRNA) a bude je doprovázet endonukleázu Cas9, vzniká směrovaná, pomocí RNA řízená, endonukleáza (RNA-guided endonuclease; RGEN; Jinek et al. 2012).

Cas9/sgRNA systém se často vnáší do buňky pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a má velké uplatnění jak v základním, tak aplikovaném výzkumu. Je ho možno využít jak u rostlin jednoděložných (např. rýže, čirok), tak u rostlin dvouděložných (např. *Arabidopsis thaliana*, tabák; Jiang et al. 2013). Tento systém je efektivní i v případě petunie (*Petunia hybrid*), okrasné květiny a modelu pro srovnávací výzkum, v němž experimentátoři ovlivňovali gen pro fytoen desaturázu, jehož mutace se projevuje albínským fenotypem (Zhang et al. 2016). V roce 2014 se dokonce jedna studie pokusila o směrovanou mutagenezi pomocí této techniky u listů sladkého pomeranče a to u CsPDS genu, ale s využitím pozměněné techniky agroinfiltrace pro zvýšenou expresi Cas9 systému. Úspěšnost mutace byla 3,2 % – 3,9 % (Jia & Nian 2014). Když se využije CRISPR/Cas9 systém, který se zacílí na geny FLOWERING LOCUS T (FT) a SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 4, tak v případě mutagenese FT rostliny odpovídají pozdějším kvetením (Hyun et al. 2014). Nicméně pro přenos do dalších generací je potřeba vyvolat změny v pohlavních buňkách, k čemuž může být využit například specifický Cas9 systém s genomic expression cassette SPOROCTLESS (Mao et al. 2015). Tento systém nemusí být ale používán jen pro směrovanou editaci jednoho genu či genů z jednoho genového klastru, ale i několika genů z různých genových klusterů. Tak tomu bylo v případě rýže *Japonica* kultivaru Kitaake, v němž byly editovány čtyři geny pro cukerné transportéry, při čemž tato změna byla přenesena i do dalších tří generací (Zhou et al. 2014).



Obrázek 3

Porovnání tří technik - ZFN, TALENs, CRISPR/Cas9, vytvářející dvoušroubovicový zlom.

Převzato z (Weeks et al. 2015)

3.2. Oligonukleotidy řízená mutagenese

Základem pro oligonukleotidy řízenou mutagenesi jsou 20 – 100 nukleotidů dlouhé modifikované DNA či DNA/RNA oligonukleotidy, které jsou homologní k vybrané části genomu organismu, ale často se liší v několika nukleotidech. Nesrovnalosti v párování bazí jsou rozpoznány reparačními mechanismy buňky a v případě, že jsou vložené oligonukleotidy použity jako reparační templát (a ne naopak), mohou vyvolat nové specifické mutace (a to i za pomoci delece) či zvrátit přítomnou mutaci. Synteticky vytvořené oligonukleotidy lze rozdělit do čtyř základních skupin dle typu použitých oligonukleotidů - na oligonukleotidy obsahující jednořetězcovou DNA, chimérické (RNA/DNA) oligonukleotidy, vytvářející jedno-nukleotidové záměny, triple helix-forming oligonukleotidy (TFOs), které tvoří s duplexem DNA poměrně pevné spojení pomocí Hoogsteenova párování, a RNA oligonukleotidy, kde RNA oligonukleotidy způsobují u cílové DNA jedno-nukleotidové sekvenční změny, které se podle RNA oligonukleotidů opraví (Lusser et al. 2011).

Chimérické oligonukleotidy se skládají z 10 krátkých 2' O-metyl RNA zbytků, které jsou metylovány proto, aby byly resistantní vůči působení RNázy H, a které lemují pět DNA úseků (Cole-Strauss et al. 1996). Jeden chimérický oligonukleotid obsahuje oblast o velikosti 25 bp homologní k vybranému genu ale obsahující několik nukleotidových změn, která ve vybraném genu vytvoří předem plánované nukleotidové záměny (Andersen et al. 2002).

Oligonukleotidy jsou vnášeny do buňky různými metodami dle buněčného typu, nejčastěji však elektroporací. Po nějaké době jsou oligonukleotidy buňkou odbourány, ale jimi způsobené mutace v genomu zůstávají (Hartung & Schiemann 2014). Příkladem šlechtitelského využití této metody jsou třeba práce na rýži, v níž experimentátoři (Okuzaki & Toriyama 2004) vytvořili tři typy chimérických oligonukleotidů, které byly navrženy tak, aby pozměnily tři tripletů (Pro-171, Trp-548, Ser-627) endogenního genu pro acetolaktátsyntázu (ALS), o níž je známo, že mutace v jejím genu je zodpovědná za rezistenci k ALS – inhibujícím herbicidům. Účinnost genové konverze byla v této práci odhadnuta jako 1×10^{-4} . Na mutacích v genu pro ALS se pracuje i u jiných druhů rostlin, např. u tabáku *Nicotiana tabacum* (Kochevenko & Willmitzer 2003; Road 1999).

3.3. RNA dependentní DNA metylace

RNA dependentní DNA metylace (RNA dependent DNA methylation; RdDM) je poslední metodikou v současné době řazenou do skupiny základních technik. Je principiálně založena na tom, že během ní nedochází ke změnám v sekvenci -mutacím nukleotidů, ale ke změně exprese genů. Touto metodikou je dosaženo u vybraných genů umlčení pomocí metylace cytosinu v oblastech jejich promotorů, které se projeví ve fenotypu organismu (Lusser et al. 2011; You et al. 2013). Pro RdDM rostlinné buňky využívají mimo jiné dvě polymerázy – a to RNA polymerázu IV a RNA polymerázu V, jejichž všechny podjednotky mají své genové zastoupení přirozeně v buňce.

Pro zacílení RdDM je potřeba indukovat tvorbu malých RNA (small interfering RNA; siRNA) proti promotorové sekvenci vybraného genu. Typicky se proto do genomu vnáší promotorová sekvence ve formě invertované repetice, tak aby byla v rostlině transkribována RNA polymerázou II. Ze vzniklé vlásenkové RNA se tvoří malé RNA, které navodí primární metylaci cytosinů v promotoru. Tuto metylaci pak může udržovat (i bez přítomnosti vneseného konstrukt) RNA Polymeráza IV, jež přepisuje transkripčně neaktivní oblasti genomu a z jejích transkriptů se opět tvoří siRNA - transkripty Pol IV se pomocí RNA dependentní RNA polymerázy 2 (RDR2) přetvoří na dvouvláknovou RNA, která je endonukleázou Dicer like 3 (DCL3) naštípana na dvouvláknové siRNA o velikosti 24 nukleotidů (Xie et al. 2004; You et al. 2013). Vybraná vlákna z těchto siRNA se navážou na protein ARGONAUTE 4 (AGO4). Komplex siRNA s AGO4 se poté může navázat na C-terminální doménu Polymerázy V (v místě bohatém na WG/GW motiv; El-shami et al. 2007). Pokud je nesené RNA vlákno komplementární se vznikajícím transkriptem Pol V, dlouhou non-coding RNA (ncRNA), tento komplex slouží jako buněčné lešení pro metylační aparát buňky - *de novo* metyltransferázy (Liu et al. 2011; You et al. 2013). AGO4 je současně i důležitým proteinem pro přirozenou ochranu a resistenci vůči patogenu *Pseudomonas syringae* u *Arabidopsis thaliana* (Agorio & Vera 2007).

Metylace některých úseků rostlinných genomů je procesem meioticky stabilním, tudíž při křížení GM rostliny s rostlinou, která není pozměněna, někteří potomci vykazují vlastnosti vzniklé pomocí RdDM. Následnými kříženími se eliminují cizí vložené geny (indukující vznik primárních siRNA), až jako výsledný produkt vznikne rostlina, která neobsahuje cizorodou genetickou informaci, ale zároveň má vlastnosti získané metylací (Lusser et al. 2011; Hartung & Schiemann 2014).

4. Transferové techniky

Název této metodicky zcela různorodé skupiny je dán jednou společnou povahou jejich produktů. Přestože byly pro jejich vznik použity tzv. „umělé genové konstrukty“, k jejich působení v celkovém organismu není nutná jejich trvalá integrace do rostlinného genomu. Přepisem těchto genů je ovšem různým způsobem cíleně ovlivňován metabolismus cílových orgánů, pletiv (respektive buněk; Lusser et al. 2011; Hartung & Schiemann 2014)

4.1. Roubování non-GM (geneticky nemodifikovaných) roubů na GM podnož

Metodika roubování je po staletí využívána v klasickém zemědělství a to především u rostlin, které lze obtížně získat samoopylením a vlastní selekcí (nejčastěji dřeviny). GM partner se může použít jako roub, nebo podnož. Jako roub je označena svrchní část rostliny (stonek, listy, květy), jako podnož naopak spodní část rostliny (tj. kořen a část stonku). Roubováním v podstatě vzniká chimérická rostlina, která má vylepšené vlastnosti. Roubování je současně vegetativním

rozmnožováním, které u dřevin výrazně snižuje období juvenility, umožňuje vytvořit multikultivar (naroubování více kultivarů na jednu podnož), či ovlivňovat tvar a velikost celkové rostliny. Mimo jiné se mohou pomocí roubování ovlivňovat i schopnosti rostliny odpovídat na biotické a abiotické stresy, či se využívají podnože, které jsou resistantní či tolerantní k virům, které by jinak rostlinu zahubily.

V takto vzniklé rostlině neustále probíhá komunikace mezi podnoží a roubem a to především floémem a xylémem. Nejčastěji se mezi nimi přenáší voda, živiny, hormony, rostlinné metabolity, malé organické molekuly, ale i některé proteiny či nukleové kyseliny (Albacete et al. 2015). Podnož silně ovlivňuje svůj roub, údaje o opačném působení z praxe postrádáme. Kdyby se tedy GM roub narouboval na nemodifikovanou podnož, tak by dle současné evropské legislativy (viz Směrnice 2001/18/ES) veškeré produkty z něj vzniklé spadaly do kategorie GM. V případě, že se pro roubování využije podnož z geneticky modifikované rostliny a na ni je naroubován non-GM roub, jsou veškeré produkty z něj vzniklé dosud klasifikovány jako non-GM, ale současně mají některé výhody geneticky modifikované rostliny (Lusser et al. 2011).

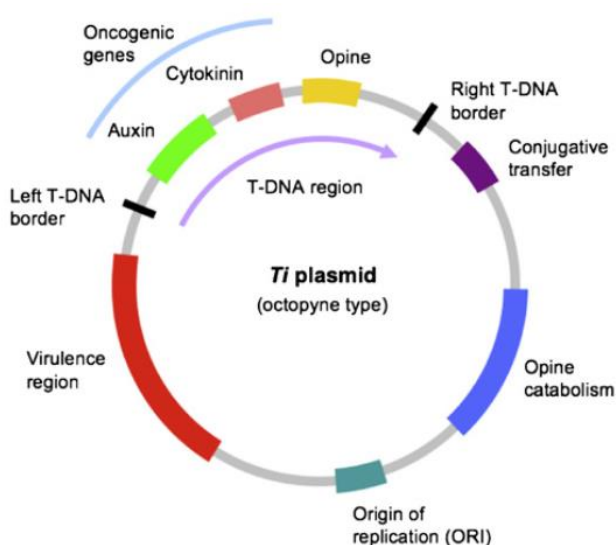
Odpůrci GM technik samozřejmě usilují o začlenění obou verzí do kategorie GM. Jejich stanovisko podporují i ojedinělá pozorování, že jak v přírodě, tak v laboratoři může v místě srůstu dojít k horizontálnímu genovému přenosu (Horizontal Gene Transfer, HGT). Mezi buňkami dvou srostlých genotypů při něm může docházet k buněčným fúzím, k výměně celých organel či dokonce kombinaci jaderných genomů (Stegemann & Bock 2009; Fuentes et al. 2014; Talianova & Janousek 2011).

V případě, že je geneticky modifikovaná, mohou exprimované transgeny ovlivnit celou rostlinu, a to z našeho pohledu jak „pozitivním“, tak „negativním“ způsobem. Například u jablka (*Malus domestica*), které bylo naroubováno na GM podnož téže odrůdy obsahující PpCBF1 gen z broskve (*Prunus persica*) navyšující odolnost proti chladu, bylo také viditelně sníženo kvetení (Artlip et al. 2016). Je proto velmi důležité vybrat správnou podnož, která dosahuje společně s roubem, požadovaných vlastností vodných do různých podmínek, jako u rajčete (*Solanum Lycopersicum* L.), u něž byla hledána správná kombinace pro odolnost k zatížení vodním stresem a suchem (Nilsen et al. 2014). Skrze podnož může docházet i ke genovému umlčování pomocí siRNAs (viz. 3.3. RNA dependentní DNA metylace). V případě studie od Zhao & Song 2014 bylo zjištěno, že siRNA produkované transgenní podnoží, mohou cestovat až do vzdálenosti 1,2 m od místa roubování, čehož by se mohlo využít v dalším výzkumu i praxi.

4.2. Agroinfiltrace

Půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* je patogenem mnoha dvouděložných rostlin, u kterých po jejich napadení způsobuje tvorbu tumorů, a to kvůli přítomnosti tumor-indukujících plasmidů (Ti-plasmidů), jejichž určitá část je jako T-DNA (transferová DNA) trvale vložena do rostlinného genomu, čímž způsobují bakteriální boulovitost kořenů (Hoekema et al. 1983; Zupan & Zambryski 1995).

Vlastní Ti-plasmid je složen z několika částí (viz Obrázek 4) - z výše zmíněné transferové DNA (T-DNA) obsahující geny kódující enzymy syntézy rostlinných hormonů (auxinu, cytokininu) a opinů, oblast kódující enzymy katabolismu opinů a hlavně oblast *vir*, která nese přibližně 35 genů zodpovědných za virulenci, jež jsou uspořádány v osmi operonech - a to *virA*, *virB*, *virC*, *virD*,



Obrázek 4

Ti-plasmid bakterie Agrobacterium tumefaciens je složen z několika částí – T-DNA, oblasti vir a oblasti kódující opinový katabolismus.

Převzato z (Păcurar et al. 2011)

virE, *virF*, *virG* a *virH*. Úsek *vir* je nezbytný, protože ovlivňuje vyštěpení, přenos a úspěšnou integraci T-DNA do rostlinného genomu (Christie 1997; Păcurar et al. 2011)

V okamžiku, kdy se dostane *Agrobacterium tumefaciens* do rostliny, začíná se několika krokový proces, který končí integrací T-DNA do jádra rostlinné buňky (více viz Zupan & Zambryski 1995; Gelvin 2000; Tzfira et al. 2003). Vlastního experimentálního vnesení bakterie do rostliny lze dosáhnout hned několika způsoby, například skrze kořenový systém rostliny (Valvekens et al. 1988), pomocí metodiky floral dip, která ovšem navozuje změny v germinální linii (Clough SJ & Bent A 1998), či např. za využití agroinfiltrace za sníženého tlaku (vacuum agroinfiltration; Jan et al. 2016; Jung et al. 2014). U některých rostlin pro úspěšnou infiltraci musí být využita kombinace výše zmíněných metod, například u sóji experimentátoři využili sonikaci s následným využitím sníženého tlaku, čímž byla umožněna agroinfiltrace u rostliny, u níž to dříve možné nebylo (King et al. 2015).

Tato technika využívá základních vlastností bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která dokáže vnést část své genetické informace do rostlinné buňky. Aby mohla být tato technika zařazena do výčtu osmi technik, na něž se nevztahuje evropská legislativa, nesmí být v experimentální rostlině (ve výsledném organismu) přítomna cizorodá T-DNA, zvláště v germinální linii, kde by se mohla přenášet do dalších generací. V současnosti je proto do NBTs zařazována agroinfiltrace „*sensu stricto*“, která se nejčastěji využívá pro výzkum vlivu patogenů na rostliny či pro produkci rekombinantních proteinů, nebo agroinokulace (Lusser et al. 2011). Agroinfiltraci jsou podrobeny jen vegetativní části rostliny (např. listy). Rostliny, které z výzkumu napodobující virové napadení vyšly jako odolné, jsou použity v dalším výzkumu (Documentation: Fact sheets on the different techniques. New breeding techniques for plants: A source of innovation for the agrofood chain and beyond [online]. 2015 [cit. 2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.nbtplatform.org/background-documents/factsheets/factsheet-agro-infiltration.pdf>).

5. Koncepční techniky

Koncepční techniky jsou dle review Hartung & Schiemann 2014 souhrnným názvem pro cisgenezi a intragenezi, reverzní křížení a syntetickou genomiku. Nejde o skupinu v pravém slova smyslu, spíše o způsob definice, protože nemají příliš společného. Cisgeneze a intrageneze jsou založeny na genovém přenosu, reverzní křížení na supresi meiózy a syntetická genomika není zatím metodikou využitelnou v současném rostlinném křížení.

5.1. Cisgeneze a intrageneze

K zavedení termínů „cisgeneze a intrageneze“ došlo poměrně nedávno, a to hlavně proto, aby se tyto metodiky rozlišily od transgenoze. Jak cisgeneze, tak intrageneze využívají DNA segmenty, které jsou organismu vlastní, či by z jiného organismu mohly být přirozeným křížením do genomu vneseny, zatímco u transgenoze se inzerují DNA segmenty z naprosto odlišného organismu, který se s příjemcem nekříží, či geny zcela umělé. Pro inzerci ve všech třech případech může být využito bakteriálního vektoru nebo jiných technik, např. biolistiky.

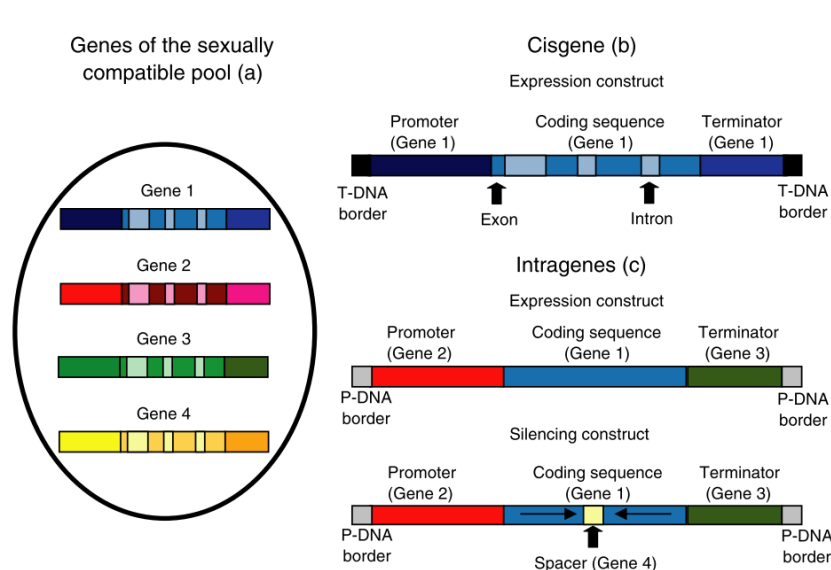
Cisgeneze byla prvně definována v knize *Toetsen en begrenzen: Een ethische en politieke beoordeling van de moderne biotechnologie* (Jochemsen & Schouten 2000) jako technika, s níž je do vybrané (cisgenní) rostliny vždy integrován jeden či několik genů (cisgenů) ze stejné rostliny, a to včetně promotorů a terminátorů. Gen mohl být s původními introny, či bez nich, navíc byl ohraničen krátkým úsekem T-DNA pocházejícím z *Agrobacterium tumefaciens*. Tato definice byla následně stejnými autory později upřesněna a doplněna informacemi, že může jít o geny pocházející i z rostliny, která je s cílovou rostlinou křížitelná (pochází ze sexuálně kompatibilního genového poolu) a tento gen je přenášen včetně všech původních intronů (Schouten et al. 2006). Protože by rostliny vytvořené za pomoci cisgeneze neměly obsahovat žádné jiné nerostlinné geny či

úseky DNA (vyjma hraničních oblastí T-DNA), snaží se tato technika vyhýbat například využití selekčních či reportérových genů (markerů). Jistou alternativou je pak použití metodiky dodatečného odstranění markerů, při níž jsou selekční genové markery ohraničeny specifickými cílovými úseky pro rekombinázu, pomocí kterých jsou markery po vložení cílového genu v následné selekci transformovaných rostlin uvolněny (po indukci rekombinázy) z rostlinného genomu (Jacobsen & Schouten 2007; Espinoza et al. 2013). Tato metodika byla poprvé využita u vektorů bez selekčních genových markerů ve vědecké práci na jahodách (Schaart et al. 2004).

Vzhledem k tomu, že u cisgeneze si experimentátor vybírá daný gen odpovídající nějaké vlastnosti, tak jeho vložení do rostlinného genomu se vyvaruje jednomu z potencionálních hlavních problémů klasického šlechtění, a to existenci genové vazby, která může způsobit, že společně s požadovanou vlastností kódovanou jedním genem se do rostliny přenesou navíc i další nechtěné, či dokonce škodlivé geny. Tím dojde k zisku neočekávaných a hlavně negativních vlastností, což může velmi zkomplikovat a hlavně zpomalit průběh klasického šlechtění (Schouten et al. 2006).

Tato technika je nejčastěji využívána u druhů, jejichž kultivary se udržují vegetativním množením, jako jsou jablka či brambory. V současné době je například u jabloně domácí (*Malus x domestica*) hojně využívána možnost vkládání genů pro rezistenci proti strupovitosti jablek, která je způsobena houbou *Venturia inaequalis*. Například u jablek odrůdy Gala bylo v jedné studii dosaženo rezistence použitím genu Rvi6 přeneseného z jiné, klasicky vyšlechtěné odolné odrůdy Florina, a tím i docíleno ochrany proti tomuto onemocnění (Vanblaere et al. 2014). V další studii byl ten samý gen pro rezistenci proti tomuto onemocnění přenesen z jiného druhu jabloně a to přesněji z jabloně mnohokvěté (*Malus floribunda* 821). Mimo jiné v této práci experimentátoři vytvářeli za pomoci cisgeneze i jabloně, které měly plody s červenou dužinou, a to přenosem genu MdMYB10 ovlivňujícím biosyntézu antokyanů v rostlině (Krens et al. 2015). I u brambor se experimentátoři zaměřují na jejich významný patogen *Phytophthora infestans* způsobující Plíseň bramborovou, která ročně způsobuje ztráty až jednu miliardu euro – a to nejen způsobenou škodou na sklizni, ale i náklady za preventivní postřiky (Haverkort et al. 2008). Základní technikou využívanou proti tomuto onemocnění je přenos genu pro rezistenci vůči tomuto patogenu. Například v experimentální práci z roku 2014 přenášeli vědci geny Rpi-vnt1.1 a Rpi-sto1 do tří variet bramboru. Nejprve vytvářeli rostliny jen s jedním genem resistance (buď Rpi-vnt1.1 nebo Rpi-sto1), které sloužily jako kontroly a vytvářely spektrum odolnosti u jednotlivých variet, a poté i jejich kombinaci, kterou porovnali s kontrolami. Bylo zjištěno, že vložení několika genů pro rezistenci, je dosahováno uspokojivých výsledků v oblasti odolnosti různých odrůd bramboru (Jo et al. 2014).

Intrageneze je technika, která se od cisgeneze výrazně liší tím, jaký gen je vkládán do cílového organismu (viz Obrázek 5). Genový konstrukt může být složen hned z několika různých genů (nejčastěji jde o kombinace různých regulačních a kódujících oblastí), ale všechny části pocházejí z druhů volně křížitelných s cílovým organismem. Takto vznikne nový gen, který se běžně v přírodě nevyskytuje (Schouten & Jacobsen 2008). Dalším významným rozdílem je ohraničení vytvořeného genu, které je na rozdíl od cisgeneze tvořeno rostlinnou DNA (plant-DNA; P-DNA). Rostlinná DNA, známá jako P-DNA, byla ve vědecké práci z roku 2004 navržena jako náhrada za T-DNA ve snaze zabránit vnesení cizorodé DNA do rostlinného genomu. P-DNA o velikosti 400 bp



Obrázek 5

Základní rozdíly mezi cisgenezí a intragenezí. V případě cisgeneze se přenáší celý gen včetně promotoru, terminátoru a intronů, v případě intrageneze se přenáší gen, který je genovým konstruktem složeným z několika samostatných genů.

Převzato z (Holme et al. 2013)

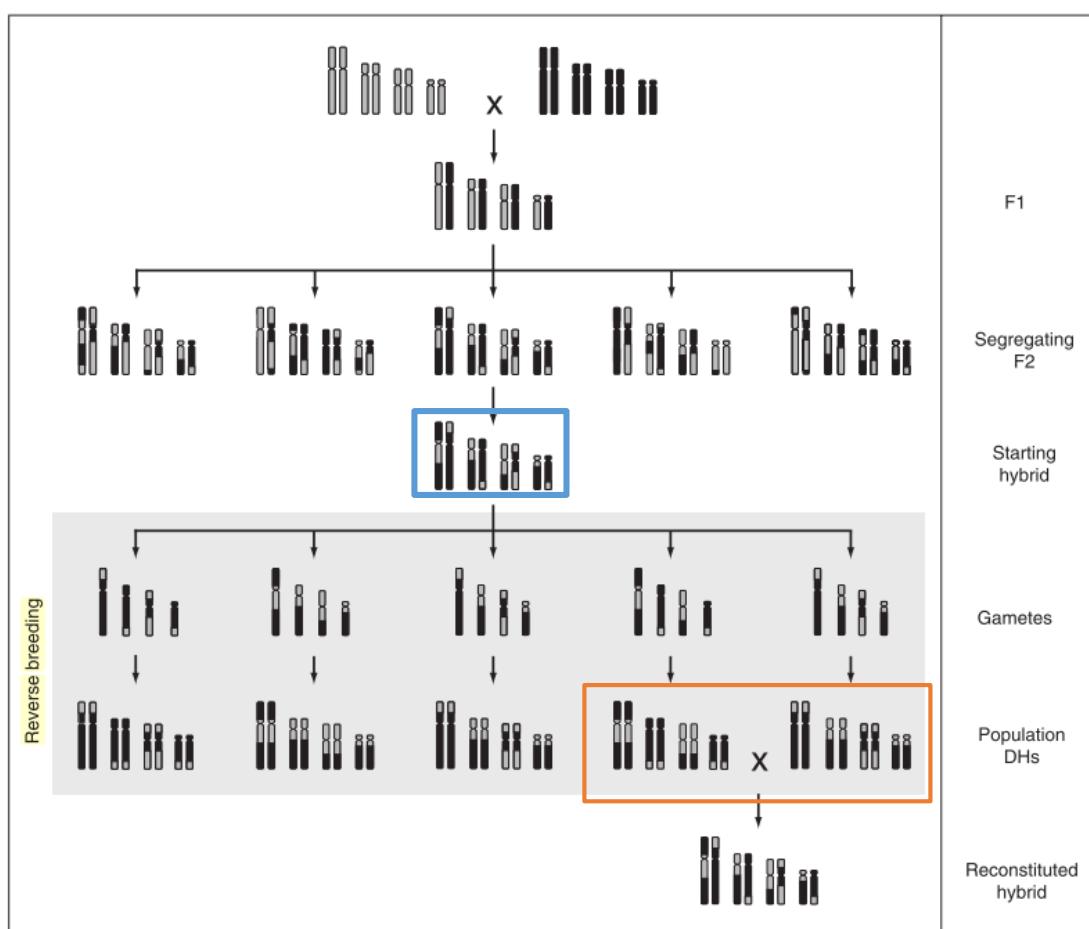
byla poprvé použita a vnesena do bramboru, při čemž její hraniční úseky sdílely homologní úseky s hraničními úseky T-DNA pocházejícími z plasmidu *A. tumefaciens* - na levé straně s nopalínovým typem a na pravé straně s oktopinovým typem (Rommens et al. 2004). Vytvoření optimálního vektoru obsahujícího P-DNA vyžaduje důkladné pochopení organizace bakteriálního vektoru, přesněji hraniční oblasti T-DNA. Práce Rommens et al. z roku 2005 popisuje vytvoření 14 nových, funkčně aktivních alternativ k pravému hraničnímu úseku T-DNA, a to jak z třídy jednoděložných, tak i dvouděložných rostlin. V současnosti se tak mohou použít například u brambor, rajčat, papriky, vaječnice či u *Arabidopsis thaliana* za dvouděložné, nebo u rýže, ječmene, pšenice za jednoděložné rostliny. Aby mohla být integrace expresních kazet považována za intragenezi, jsou stejně jako u cisgeneze potřebné bezmarkerové transformační systémy (Rommens et al. 2007).

V praxi může být intrageneze aplikována například u šlechtění bramboru. Velkým ekonomickým i zdravotním problémem je u brambor tzv. chladové sládnutí skladovaných hlíz. Takto vzniklé jednoduché redukující cukry při smažení lupínků či hranolků interagují zejména s přítomnými bílkovinami či aminokyselinami v tzv. Maillardově reakci. Lupínky (hranolky) hnědnou a navíc se v nich vytvářejí různé kancerogenní produkty (např. akrylamid).

Experimentátoři (Rommens et al. 2006) využili této metodiky u odrůdy Ranger Russet k umlčení tří genů (Ppo, R1 a PhL), které z výše zmíněných důvodů svojí expresí neumožnily využívat tuto odrůdu komerčně zejména pro výrobu hranolků. Navíc se u této odrůdy projevovalo (z důvodu větší náchylnosti k pomačkání) rychlé černání hlíz brambor. Snižování akrylamidu ve smažených bramborových produktech bylo cílem i v jiné studii, kde se pomocí současného umlčení genů StAs1 a StAs2 dosáhlo snížení hromadění volného asparaginu, který je jedním z hlavních akrylamidových prekursorů (Rommens et al. 2008).

5.2. Reverzní křížení

Další metodikou řadící se do koncepčních technik je reverzní křížení. Cílem této techniky je především vytvoření dvou perfektně se doplňujících homozygotních parentálních linií, jejichž křížením bude stabilně vznikat homogenní elitní populace heterozygotů. Principiálně je založena



Obrázek 6

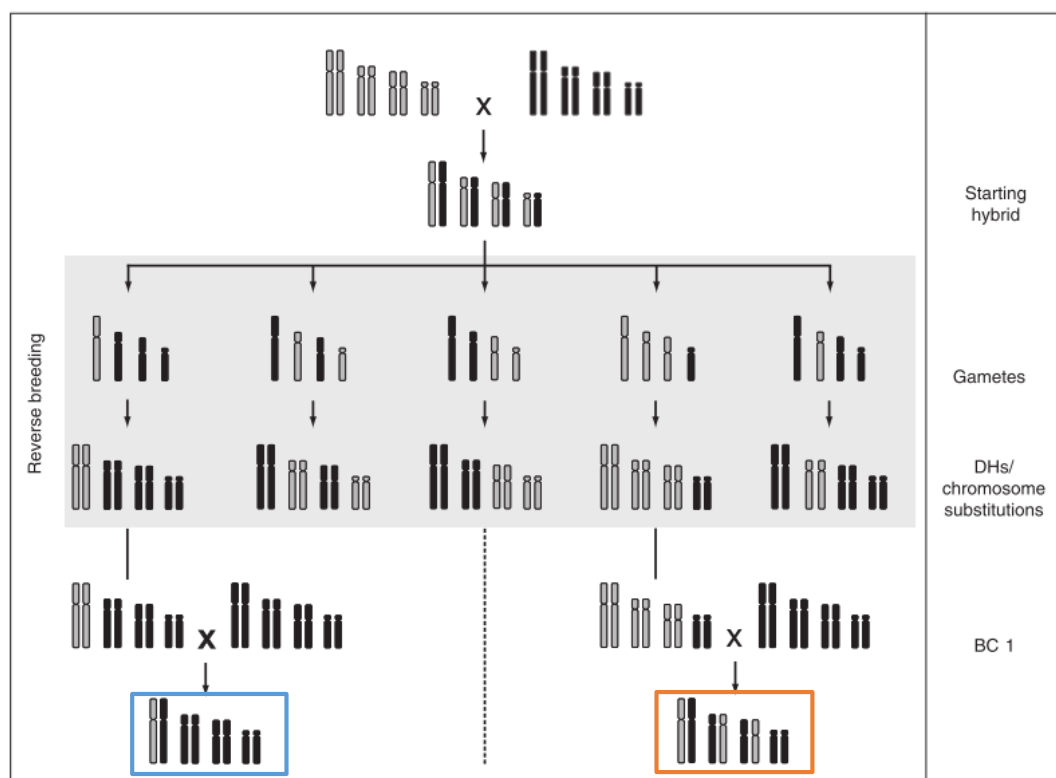
Schéma postupu v průběhu reverzního křížení pro získání heterozygotních rostlin se stejným genomem a fenotypovými vlastnostmi jako předem vybraná rostlina.

V modrém rámečku je vybrán rostlinný heterozygot, v červeném rámečku jsou homozygotní rostliny, které svým zkřížením dají vzniknout rostlině odpovídající původnímu chtěnému heterozygotovi.

Převzato a upraveno podle (Dirks et al. 2009)

na potlačení genetické rekombinace u vybraných nejlepších heterozygotů skrze eliminaci crossing-overů v průběhu jejich meiózy a nalezení vhodné kombinace dihaploidních linií odvozených z takto vzniklých haploidních spor (Dirks et al. 2009; Lusser et al. 2011).

Hlavním důvodem pro využívání metodiky reverzního křížení je navození tzv. heterózního efektu. Díky němu potomci dvou homozygotních linií dosahují výrazně lepších fenotypových vlastností než jejich rodiče (velikost rostliny a plodů/semen, odolnost...), což je z hlediska zemědělství a ekonomiky velmi významným faktorem (Springer & Stupar 2007). Tuto techniku lze aplikovat ve dvou základních případech. U heterozygotních rostlin, u nichž neznáme homozygotní předky, lze takto získat homozygotní parentální linie, které následně při zkřížení budou společně plodit heterozygotní potomstvo stejné jako původní vybraná rostlina (viz Obrázek 6). Nebo u rostlin F1 generace se známými parentálními liniemi, u nichž byly eliminovány crossing-overů za účelem vzniku chromozomálních substitučních linií, které mohou být zpětně kříženy s jednou z homozygotních parentálních linií (viz Obrázek 7). Chromozomové substituční linie jsou významné tím, že se na nich může studovat problematika genových interakcí (i mezi více geny). V tomto případě jsou experimentálně připraveny rostliny jen s jedním homozygotním chromozomem. Pro



Obrázek 7

Vytváření chromozomálních substitučních linií.

Vlevo v modrém rámečku vzniká linie homozygotní jen s jedním chromozomem heterozygotním, vpravo v červeném rámečku vzniká naopak rostlina heterozygotní až na jeden homozygotní chromozom.

Převzato a upraveno podle (Dirks et al. 2009)

studium vlastností plynoucích pouze z jednoho chromozomu jsou využívány linie vytvořené pouze s jedním heterozygotním chromozomem (Dirks et al. 2009).

V obou případech proces vždy začíná výběrem elitní heterozygotní rostliny s požadovanými kombinacemi vlastností. U této rostliny (ať už F1, F2 či nějaké další generace) je vypnut gen (a to nejčastěji za využití RNA interference - pomocí siRNA způsobujících post-transkripční umlčení genu; Dirks et al. 2009), který je nezbytný pro proběhnutí crossing-overu. Nejčastěji je to gen pro *Dmc1* rekombinázu patřící do rekombinázové super-rodiny RecA/Rad51, nebo gen *spo11*, jenž je zodpovědný za dvoušroubovicové zlomy v celém chromozomu (Kagawa & Kurumizaka 2010). V okamžiku, kdy buňce zabráníme rekombinaci (crossing-overu) v průběhu meiózy, nedochází k překřížení sesterských chromosomů (nevytváří se chiasmata), čemuž se říká achiasmatická meióza. V důsledku toho dojde v průběhu meiotické anafáze I k rozchodu nerekombinovaných parentálních chromozómů – tzv. univalentů (Dirks et al. 2009; Wijnker et al. 2014). V průběhu druhé části meiózy dojde k oddělení identických chromatid. Z haploidních spor vytvoří experimentátoři dihaploidní rostlinu, která je kompletně homozygotní (tj. má identické homologní chromozómy; Dirks et al. 2009; Lusser et al. 2011).

Následně se v případě heterozygotních rostlin, u nichž neznáme homozygotní předky, postupuje tak, že se vyberou dvě rostliny, jež se navzájem geneticky doplňují, a svým zkřížením dají vzniknout linii, která má stejný genotyp jako původní heterozygotní rostlina. U rostlin, z nichž mají pocházet substituční chromozomální linie, se vybrané rostliny zkříží s jednou z parentálních linií podle toho, k jakému typu chromozomální linie má výsledná rostlina patřit (s jedním homozygotním, nebo s jedním heterozygotním chromosomem; Wijnker et al. 2014).

5.3. Syntetická genomika

Tato metodika byla zařazena skupinou *New Techniques Working Group* (NTWG) na seznam technik k posouzení a zhodnocení z hlediska legislativy ošetřující GMO v EU, i přes to, že v současné době či brzké budoucnosti se neočekává, že bude pro rostlinné šlechtitelství využívána (Lusser et al. 2011).

Syntetická genomika, která je definována jako technika, která vytváří či přetváří dle technického vzoru biologické systémy či jen jejich komponenty za účelem vytvoření předvídatelných vlastností a funkcí, které se ale v přírodě přirozeně nevyskytují. Z mnoha možností, které by tato metodika dokázala v budoucnosti poskytovat, se dají některé vyzdvihnout. Velké významnosti jistě dosáhne v biomedicínském odvětví, při výrobě biosyntetickým farmaceutik, ve výrobě inteligentních (smart) materiálů či nanomateriálů, při snaze vytvořit udržitelný chemický průmysl a v neposlední řadě i v biologické nápravě životního prostředí a vytváření energií a biologických paliv (Nest High-level Expert Group 2005).

6. Analytické techniky

Čtvrtou a zároveň poslední skupinou technik jsou techniky analytické. Tyto techniky samy o sobě do šlechtění nezasahují (nejsou proto ošetřeny evropskou ani českou legislativou), ale jsou významnou a často i nedílnou součástí pro fungování jiných technik, především ze skupiny základních a koncepčních technik. Pomocí analytických technik (například sekvenování příští generace, genomika, transkriptomika, proteomika a další), se získají informace, které jsou nezbytné pro vytvoření a fungování prvních dvou výše zmíněných skupin technik (Hartung & Schiemann 2014).

7. Závěr

Moderní šlechtění rostlin je realizováno pomocí stále se rozšiřujícího souboru klasických i nových technik. Metodické i biologické limity standardního pohlavního křížení, právě tak jako indukované mutagenese, byly před více jak třiceti lety rozšířeny pomocí přímého genového přenosu (transgenoze). Ve světě jsou v současnosti pěstovány nejrůznější geneticky modifikované (GM) plodiny na milionech hektarů orné půdy. Mají svoje nepopíratelné přednosti, ale v očích jak laické veřejnosti, tak konzervativních odborníků, představují prozatím i potenciální riziko pro člověka či přírodní ekosystémy. Řada států, včetně těch sdružených v EU, se tedy průběžně snaží využití GM organismů i produktů legislativně omezit až vyloučit.

Soubor tzv. „nových šlechtitelských technik“ (New Breeding techniques, NBT) dokumentuje vědeckou a odbornou snahu nalézt v tomto konfliktu kompromisní řešení, jež by převratné poznatky genetického inženýrství zpřístupnilo i široké šlechtitelské praxi. U těchto technik jako takových vznikají vždy jako konečný produkt rostliny, které ve svém genomu nemají vloženou cizorodou genetickou informaci a v případě, kdy ji vloženou mají, tak nepřekračuje jejich velikost 20pb (např. ZNF-3). Existují proto jako mezistupeň mezi klasickým šlechtěním a šlechtěním pomocí genetických modifikací. Přestože mají spoustu výhod – např. zisk předem vybrané vlastnosti, urychlení mnohaletého šlechtitelského procesu, vyšlechtění nové odrůdy - existuje i několik nevýhod (časová náročnost přípravy metodiky, nemožnost u některých rostlin metodiky provést, atd.), které jsou ovšem odlišné od techniky k technice.

Metodiky spadající do skupiny základních technik mají sice společné to, že modifikace pomocí nich jsou vždy cílené v předem vybraných oblastech (rostlinného) genomu, ale právě s touto vlastností se pojí nutnost znát sekvenci genomu experimentátorem vybraného organismu. Bez předchozí znalosti sekvence úseku DNA by vůbec nebylo možné synteticky vytvořit prostředky, jimiž výše zmíněné techniky mutagenese provádí (úseky homologní danému úseku DNA či proteiny s tímto úsekem interagující). I vlastní příprava konstruktů potřebných pro tyto techniky je časově i finančně náročná (zejména při přípravě ZFN či TALEN), a následně je i velmi obtížné získání a selekce úspěšně modifikovaných jedinců.

U cisgeneze a intrageneze je rovněž výsledkem organismus, který je pozměněn v nějaké předem určené vlastnosti, nicméně je ho dosahováno zcela jiným postupem, skrze vložení genu kódujícího vybranou vlastnost. Protože je do organismu vkládána genetická informace z něj samotného či druhu s ním přirozeně křížitelného, je cisgeneze často logicky presentována jako „opak“ transgenoze, která je založena na integraci cizorodé DNA. S integrací určitého úseku DNA se však stále pojí nedůvěřivost ze strany společnosti. Dle publikace od Hudson et al. 2015 je veřejné mínění o cisgenezi a transgenozí silně založeno na pohlaví a socioekonomickém statutu je-

dince ve společnosti, či jeho vzdělání a náboženském vyznání. U respondentů bylo zjištěno, že většina z nich považuje cisgenezi za méně nebezpečnou či nepřirozenou, nežli je transgenoze, ale jasná podpora této metodiky nebyla v žádném hodnotícím státě projevona. Zajímavým potvrzeným zjištěním bylo to, že u mužů i žen, kteří měli otce vzdělaného v přírodních vědách, je větší pravděpodobnost kladného přijetí cisgeneze. Technika intrageneze je pak se svým vytvářením genových konstruktů blíže spíše k transgenozí, byť je genový konstrukt vytvořen vždy z organismů, které jsou s tím cílovým volně křížitelné.

U roubování non-GM roubů na GM podnož nedochází k cíleným mutacím či k žádné integraci genu do rostlinné DNA. Dle původní koncepce by tedy produkty roubu, který nebyl geneticky modifikován, neměly nést označení GMO. Výsledná rostlina přitom dosahuje ve výsledku lepších vlastností, kterých by bez GM podnože neměla. Výrazně tak ovlivňuje zemědělství zejména v ovocnářství. Nicméně jak vyšlo najevo již v průběhu popisu této techniky, podnož s roubem silně komunikuje (skrže malé RNA) a v místě srůstu byl mezi sousedními buňkami potvrzen i horizontální přenos genů.

Velkou kapitolou samo o sobě by měla být agroinfiltrace, protože sama tato metodika je využívána už několik desítek let a bez jejího použití by se mnohé výše zmíněné postupy provést nemohly. Nicméně v rámci NBTs seznamu je zařazena jen určitá část agroinfiltrace, přesněji agroinfiltrace „*sensu stricto*“ a agroinokulace, při čemž v obou metodách je využito přirozených schopností této bakterie, ale vložená genetická informace není přenášena do další generace organismu. Obě slouží nejčastěji ke zjišťování průběhů infekce v rostlinách za působení určitého patogenu, s následným výběrem odolných rostlin k dalšímu křížení, nebo pro produkci rekombinantních proteinů.

V případě reverzního křížení GM rostliny vznikají pouze jako meziprodukt, vnesené transgeny nejsou do další generace přeneseny (jsou vybrány linie, které inzerce nenesou). Tato technika umožňuje opakované získání elitních heterozygotních rostlin, které, jak již bylo zmíněno, vykazují lepší vlastnosti nežli rostliny patřící do jejich parentálních linií, a tím je umožněno mnohonásobné urychlení vzniku těchto heterozygotů, mimo jiné i při šlechtění rostlin, které budou vhodné například pro organické zemědělství (Andersen et al. 2015). Ovšem současně využití v organickém zemědělství naráží na tzv. „princip předběžné opatrnosti“, který je skeptický ke všem zásahům člověka do přírody, a tedy i k NBTs (Lammerts Van Bueren et al. 2007). Technicky je v současné době využití reverzního křížení omezené u všech rostlin s počtem haploidních chromozomů vyšším než 12, protože při vyšším počtu je extrémně těžké (či až nemožné) ve vzniklém množství dihaploidů hledat vhodný a doplňující se pár rostlin (Lusser et al. 2011).

Syntetická genomika je v současné době ne zcela reálnou možností pro rostlinné šlechtění, nicméně do budoucna je s ní počítáno jako s metodikou, která by zcela změnila způsob rostlinného šlechtění. Mohla by přinášet mnoho výhod a to jak z hlediska udržitelnosti průmyslu jako takového, tak i ochrany a nápravy životního prostředí.

Seznam použité literatury

(Sekundární citace označeny *)

- Agorio, A. & Vera, P., 2007. ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 19(11), pp.3778–3790.
- Albacete, A. et al., 2015. Unravelling rootstock×scion interactions to improve food security. *Journal of Experimental Botany*, 66(8), pp.2211–2226.
- Andersen, M.M. et al., 2015. Feasibility of new breeding techniques for organic farming. *Trends in Plant Science*, 20(7), pp.426–434. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.011>.
- Andersen, M.S. et al., 2002. Mechanisms underlying targeted gene correction using chimeric RNA/DNA and single-stranded DNA oligonucleotides. *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), pp.770–781.
- Artlip, T.S. et al., 2016. An apple rootstock overexpressing a peach CBF gene alters growth and flowering in the scion but does not impact cold hardiness or dormancy. *Horticulture Research*, 3(January), p.16006. Available at: <http://www.nature.com/articles/hortres20166>.
- Bonas, U., Stall, R.E. & Staskawicz, B., 1989. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular & general genetics* : MGG, 218(1), pp.127–136.
- Butelli, E. et al., 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology*, 26(11), pp.1301–1308. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18953354.
- Cole-Strauss, A. et al., 1996. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science*, 273(5280), pp.1386–1389. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703073>.
- Dirks, R. et al., 2009. Reverse breeding: A novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal*, 7(9), pp.837–845.
- Documentation: Fact sheets on the different techniques. *New breeding techniques for plants: A source of innovation for the agrofood chain and beyond* [online]. 2015 [cit. 2016-06-24]. Dostupné z: <http://www.nbtplatform.org/background-documents/factsheets/factsheet-site-directed-nucleases.pdf>
- Documentation: Fact sheets on the different techniques. *New breeding techniques for plants: A source of innovation for the agrofood chain and beyond* [online]. 2015 [cit. 2016-08-12]. Dostupné z: <http://www.nbtplatform.org/background-documents/factsheets/factsheet-agro-infiltration.pdf>

- Drobník, J., 2008. *Biotechnologie a společnost*, Praha: Nakladatelství Karolinum.
- Durai, S. et al., 2005. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33(18), pp.5978–5990.
- El-shami, M. et al., 2007. Reiterated WG / GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components service Reiterated WG / GW motifs form functionally and evolutionarily conserved platforms in RNAi-related components. *Genes & Development*, pp.2539–2544.
- Espinoza, C. et al., 2013. Cisgenesis and intragenesis: New tools for improving crops. *Biological Research*, 46(4), pp.323–331.
- Fuentes, I. et al., 2014. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature*, 511(7508), pp.232–235. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909992>.
- Fujii, W. et al., 2013. Repeatable Construction Method for Engineered Zinc Finger Nuclease Based on Overlap Extension PCR and TA-Cloning. *PLoS ONE*, 8(3), pp.1–11.
- Gaj, T., Gersbach, C.A. & Barbas, C.F., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), pp.397–405. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>.
- Gelvin, S.B., 2000. Agrobacterium and Plant Genes Involved in T-DNA Transer and Integration. *Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 51, pp.223–256.
- Grunewald, W. & Bury, J., 2016. *The GMO revolution* 01 edition., Lannoo Publishers.
- Hake, S. & Ross-Ibarra, J., 2015. Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *eLife*, 2015(4), pp.1–8.
- Halford, N.G., 2003. *Genetically Modified Crops* 01 edition., Imperial College Press.
- Hartung, F. & Schiemann, J., 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: Opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant Journal*, 78(5), pp.742–752.
- Haverkort, A.J. et al., 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*, 51(1), pp.47–57.
- Hoekema, a. et al., 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature*, 303(5913), pp.179–180.
- Holme, I.B., Wendt, T. & Holm, P.B., 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, 11(4), pp.395–407.
- Hudson, J., Caplanova, A. & Novak, M., 2015. Public attitudes to GM foods. The balancing

- of risks and gains. *Appetite*, 92, pp.303–313. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195666315002767>.
- Hussain, B., 2015. Modernization in plant breeding approaches for improving biotic stress resistance in crop plants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(4), pp.515–530. Available at: <http://online.journals.tubitak.gov.tr/open-DoiPdf.htm?mKodu=tar-1406-176>.
- Hyun, Y. et al., 2014. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*, 241(1), pp.271–284.
- Christie, P., 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transpos apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 179(10), pp.3085–3094.
- Jacobsen, E. & Schouten, H.J., 2007. Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology*, 25(5), pp.219–223.
- Jan, S.A. et al., 2016. In-planta transformation : recent advances. , 21(1), pp.11085–11091.
- Jankele, R. & Svoboda, P., 2014. TAL effectors: tools for DNA targeting. *Briefings in functional genomics*, 13(5), pp.409–19. Available at: <http://bfg.oxfordjournals.org/content/early/2014/06/06/bfgp.elu013.short>.
- Jänsch, M. et al., 2014. A Phenotypic, Molecular and Biochemical Characterization of the First Cisgenic Scab-Resistant Apple Variety “Gala.” *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(3), pp.679–690.
- Jia, H. & Nian, W., 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE*, 9(4).
- Jiang, W. et al., 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20), pp.1–12.
- Jinek, M. et al., 2012. A Programmable Dual-RNA – Guided. *Science (New York, N.Y.)*, 337(August), pp.816–822.
- Jo, K.-R. et al., 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC biotechnology*, 14(1), p.50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4075930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jochemsen, H. & Schouten, H.J., 2000. *Toetsen en begrenzen: Een ethische en politieke beoordeling van de moderne biotechnologie* 01 edition., Buijten & Schipperheijn.

- Jung, S.K. et al., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient expression of plant cell wall-degrading enzymes in detached sunflower leaves. *Biotechnology Progress*, 30(4), pp.905–915.
- Kagawa, W. & Kurumizaka, H., 2010. From meiosis to postmeiotic events: Uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *FEBS Journal*, 277(3), pp.590–598.
- King, J.L., Finer, J.J. & McHale, L.K., 2015. Development and optimization of agroinfiltration for soybean. *Plant Cell Reports*, 34(1), pp.133–140.
- Kochevenko, A. & Willmitzer, L., 2003. Chimeric RNA/DNA Oligonucleotide-based Site-Specific Modification of the Tobacco Acetolactate Synthase Gene. *Plant physiology*, 132(May), pp.174–184.
- Krens, F. a. et al., 2015. Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Frontiers in Plant Science*, 6(161). Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00286/abstract>.
- Lammerts Van Bueren, E.T. et al., 2007. Organic agriculture requires process rather than product evaluation of novel breeding techniques. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 54(4), pp.401–412. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1573-5214\(07\)80012-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1573-5214(07)80012-1).
- Liu, J. et al., 2011. An atypical component of RNA-directed DNA methylation machinery has both DNA methylation-dependent and -independent roles in locus-specific transcriptional gene silencing. *Cell Research*, 21(12), pp.1691–1700. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.173>.
- Lusser, M. et al., 2011. *New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development* *New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects*, Available at: <http://bookshop.europa.eu/en/new-plant-breeding-techniques-pbLFNA24760/?AllPersonalAuthorNames=true>.
- Mao, Y. et al., 2015. Development of germ-line-specific CRISPR-Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, pp.519–532.
- Mendel, G., 1865. Experiments in Plant Hybridization. *Journal of the Royal Horticultural Society*, IV(1865), pp.3–47. Available at: <http://www.esp.org/foundations/genetics/classical/gm-65.pdf>.
- Miladinovic, J. et al., 2015. New trends in plant breeding - example of soybean. *Genetika*, 47(1), pp.131–142. Available at: <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0534-00121501131M>.
- Nest High-level Expert Group, 2005. *Synthetic Biology Applying Engineering to Biology*,

Available at: ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nest/docs/syntheticbiology_b5_eur21796_en.pdf.

New plant breeding techniques. *European Commission: Plants* [online]. [cit. 2016-07-24]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm

Nilsen, E.T. et al., 2014. A rootstock provides water conservation for a grafted commercial tomato (*solanum lycopersicum* L.) line in response to mild-drought conditions: A focus on vegetative growth and photosynthetic. *PLoS ONE*, 9(12), pp.1–22.

Nishizawa-Yokoi, A. et al., 2016. A Defect in DNA Ligase4 Enhances the Frequency of TA-LLEN-Mediated Targeted Mutagenesis in Rice. *Plant Physiology*, 170(2), pp.653–666. Available at: <http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.15.01542>.

Okuzaki, A. & Toriyama, K., 2004. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports*, 22(7), pp.509–512.

Păcurar, D.I. et al., 2011. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), pp.76–81.

Parlament, E. & Rada Evropské Unie, 2001. Směrnice Evropského parlamentu a rady 2001/18/ES. , 2000(12).

* Pavletich, N.P. & Pabo, C., 1991. Zinc Structure of a Recognition : Complex Zif268-DNA. *Advancement Of Science*, 252(5007), pp.809–817 cit. podle Durai, S. et al., 2005. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33(18), pp.5978–5990.

Puchta, H. & Fauser, F., 2014. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: Prospects for a bright future. *Plant Journal*, 78(5), pp.727–741.

Road, T., 1999. A tool for functional plant genomics : Chimeric RNA / DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations. , 96(July), pp.8774–8778.

Rommens, C.M. et al., 2004. Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant physiology*, 135(1), pp.421–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15133156> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC429395>.

Rommens, C.M. et al., 2006. Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), pp.9882–9887.

Rommens, C.M. et al., 2008. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal*, 6(8), pp.843–853.

Rommens, C.M. et al., 2005. Plant-derived transfer DNAs. *Plant physiology*, 139(3), pp.1338–1349.

Rommens, C.M. et al., 2007. The intragenic approach as a new extension to traditional

- plant breeding. *Trends in Plant Science*, 12(9), pp.397–403.
- Schaart, J.G. et al., 2004. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnology Journal*, 2(3), pp.233–240.
- Scholze, H. & Boch, J., 2010. TAL effector-DNA specificity. *Virulence*, 1(5), pp.428–432.
- Schornack, S. et al., 2006. Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), pp.256–272.
- Schouten, H.J. & Jacobsen, E., 2008. Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. *Trends in Plant Science*, 13(6), pp.260–261.
- Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E., 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO reports*, 7(8), pp.750–3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1525145&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Springer, N.M. & Stupar, R.M., 2007. Allelic variation and heterosis in maize: How do two halves make more than a whole? *Genome Research*, 17(3), pp.264–275.
- Stegemann, S. & Bock, R., 2009. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5927), pp.649–651. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19407205>.
- Sweeney, M. & McCouch, S., 2007. The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, 100(5), pp.951–957.
- Talianova, M. & Janousek, B., 2011. What can we learn from tobacco and other solanaceae about horizontal DNA transfer? *American Journal of Botany*, 98(8), pp.1231–1242.
- Tzfira, T. et al., 2003. Site-Specific Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA via Double-Stranded Intermediates. *Plant Physiology*, 133(November), pp.1011–1023.
- Vagera, J., Novotný, J. & Ohnoutková, L., 2004. Induced androgenesis in vitro in mutated populations of barley, *Hordeum vulgare*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(1), pp.55–61.
- Vanblaere, T. et al., 2014. Molecular characterization of cisgenic lines of apple “Gala” carrying the Rvi6 scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal*, 12(1), pp.2–9.
- Weeks, D.P., Spalding, M.H. & Yang, B., 2015. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnology Journal*, pp.483–495.
- Wijnker, E. et al., 2014. Hybrid recreation by reverse breeding in *Arabidopsis thaliana*.

- Nature protocols*, 9(4), pp.761–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/24603935>.
- Xie, Z. et al., 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5), pp.642–652.
- Ye, X. et al., 2000. Engineering the provitamin A beta-carotene biosynthetic pathway into carot ... , 287(January), pp.303–306.
- You, W. et al., 2013. Interplay among RNA polymerases II, IV and V in RNA-directed DNA methylation at a low copy transgene locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 82(1-2), pp.85–96.
- Zhang, B. et al., 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in *Petunia*. *Scientific Reports*, 6(February), p.20315. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep20315>.
- Zhao, D. & Song, G.Q., 2014. Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant Biotechnology Journal*, 12(9), pp.1319–1328.
- Zhou, H. et al., 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic acids research*, 42(17), pp.10903–14. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org.ezproxy.library.wur.nl/content/42/17/10903>.
- Zupan, J.R. & Zambryski, P., 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant cell. *Plant Physiology*, 107(1 995), pp.1041–1047.